



**Recenzja pracy doktorskiej Katarzyny Ratajczak: „Działanie cytotoksyczne i proapoptotyczne resweratrolu na wybrane nowotwory przewodu pokarmowego w badaniach *in vitro*”**

Promotor pracy: prof. dr hab. Piotr Dzięgiel

Promotor pomocniczy: dr Sylwia Borska

Od dziesięcioleci wrasta zachorowalność na nowotwory w krajach wysokorozwiniętych. Przyczyny tego są złożone, co nie zmienia faktu, że występuje pilna potrzeba walki z tą straszną chorobą. Do niedawna głównymi sposobami walki z nowotworami, poza zabiegami chirurgicznymi i napromieniowaniem zmian, były klasyczne leki chemioterapeutyczne o niskim poziomie specyficzności. Ostatnio do zestawu środków dołączyły inhibitory kinaz tyrozynowych, przeciwciała monoklonalne oraz techniki stymulacji układu immunologicznego. Jednym z ważnych podejść terapeutycznych jest także użycie naturalnych, najczęściej roślinnych związków bioaktywnych występujących w naturalnej diecie człowieka dla których udowodniono aktywność przeciwnowotworową. Są to najczęściej związki polifenolowe, których selektywny mechanizm działania powoduje, że wiąże się z nimi duże nadzieje na poprawę procedur leczniczych oraz zmniejszenie toksyczności terapii. Do takich ciekawych, ale wciąż wykorzystanych w niewielkim stopniu związków należy resweratrol - naturalna pochodna stilbenu występująca w nasionach i owocach kilkunastu roślin. Jego właściwości hamowania proliferacji komórek nowotworowych oraz zmniejszania oporności komórek względem klasycznych chemioterapeutyków czynią z niego ciekawy obiekt badań. Jednak jego zastosowanie ogranicza bardzo niska rozpuszczalność w wodzie, słaba biodostępność, jak również szybki metabolizm. Równocześnie z pracami badawczymi nad resweratrolem trwają prace rozwojowe w celu opracowania metod jego wydajnego dostarczenia w postaci różnego rodzaju nanoosłonków, a nawet suplementów diety. O ważności badań nad



resweratrolem świadczą również informacje powtarzane w prasie popularnonaukowej, a potwierdzone przez rzetelne badania naukowe, że wysokie dawki doustnego resweratrolu podane razem z ubichinolem wpływają na spowolnienie rozwoju glejaka wielopostaciowego.

W trend badania naturalnych związków polifenolowych w kontekście wspierania obecnych terapii nowotworowych wpisuje się rozprawa doktorska mgr Katarzyny Ratajczak zatytułowana: „Działanie cytotoksyczne i proapoptotyczne resweratrolu na wybrane nowotwory przewodu pokarmowego w badaniach *in vitro*”. Promotorem pracy jest Prof. dr hab. Piotr Dzięgiel, a promotorem pomocniczym jest dr Sylwia Borska. Praca ta powstała w Katedrze Morfologii i Embriologii Człowieka, w Zakładzie Histologii i Embriologii.

Zespół, w którym doktorantka wykonała swoje badania znany jest między innymi z badań nad naturalnymi związkami roślinnymi i ich wpływem na wielolekooporność nowotworów. Praca składa się z cyklu trzech monotematycznych prac poświęconych aktywności resweratrolu względem nowotworów układu pokarmowego. Dwie spośród cyklu to prace eksperymentalne, a jedna to wartościowa praca przeglądowa. Sumaryczny współczynnik oddziaływania (IF) publikacji stanowiących dokonanie naukowe doktorantki to 11,725 (295 punktów MNiSW). We wszystkich pracach doktorantka jest pierwszym autorem oraz jednocześnie autorem korespondującym, co świadczy o jej kluczowym zaangażowaniu w proces powstawania manuskryptów, edycji oraz późniejszym procesem odpowiedzi na uwagi recenzentów i finalną ich korektę. Deklarowany udział w publikacjach doktorantki można uznać za dominujący. Dodatkowo doktorantka jest współautorem kolejnych 4 prac badawczych oraz 14 doniesień konferencyjnych.

Cykl publikacji opatrzony jest krótkim wprowadzeniem pozwalającym rozeznąć się w tematyce jaką zajmowała się mgr. Katarzyna Ratajczak, dalej znajduje się rozdział poświęcony Założeniom i celom pracy oraz rozdział Streszczenie, w którym doktorantka streszcza najważniejsze wyniki uzyskane w poszczególnych pracach. Ten rozdział pozwala przygotować się na lekturę poszczególnych publikacji oraz podaje najważniejsze osiągnięcia. Dalej znajdują się wpięte prace będące dokonaniem naukowym doktorantki oraz krótki rozdział Podsumowanie i wnioski, w którym doktorantka wylicza najważniejsze wnioski płynące z wykonanych badań. Na końcu znajdują się oświadczenia wszystkich autorów prac i pozostały dorobek naukowy.



Praca doktorska mgr Katarzyny Ratajczak jest zbiorem ciekawych i wartościowych badań poświęconych wpływowi resweratrolu na komórki wybranych nowotworów przewodu pokarmowego. W pracy nr I są to nowotwory żołądka, z których dwie wybrane linie charakteryzowały się opornością na cytostatyki: daunorubicynę - linia EPG85-257RDB, oraz mitoksantron - linia EPG85-257RNOV, natomiast trzecia użyta linia to linia wrażliwa na cytostatyki - EPG85-257P. Na wstępie wykonano badania ekspresji genów i białek związanych z opornością wielolekową (real-time PCR oraz Western Blot) oraz potwierdzono obecność tych białek w liniach komórkowych metodą innunofluorescencji. Potwierdzono ekspresję genu *ABCB1* odpowiedzialnego za oporność na daunorubicynę. Co istotne traktowanie komórek resweratrole w stężeniu 30  $\mu$ M znacząco obniżyło ekspresję tego genu a tym samym obniżyło poziom odpowiadającego mu białka. Dodatkowo traktowanie resweratrole obniżyło poziom ekspresji genu *ANXA1*, który jest pośrednio związany z opornością. Zaobserwowano także wzrost poziomu aneksyny I gdy komórki traktowano zwiększającym się stężeniem resweratrolu. Do innych bardzo ważnych obserwacji należy odkrycie, że resweratrol obniża poziom białka tioredoksyny – bardzo ważnego komórkowego reduktora odpowiedzialnego za równowagę wolnorodnikową komórek. Brak tioredoksyny zwiększa prawdopodobieństwo skutecznego działania daunorubicyny poprzez mechanizmy wolnorodnikowe. W przypadku linii komórkowej odpornej na mitoksantron zauważono również obniżenie ekspresji tioredoksyny co ma takie samo znaczenie jak w przypadku daunorubicyny.

W drugiej pracy eksperymentalnej (praca nr III) badano trzy wybrane linie nowotworu trzustki. Rak trzustki jest niezwykle trudnym do zdiagnozowania i leczenia nowotworem. Znalezienie sposobu na dostarczenie substancji wpływających na zmniejszenie się oporności komórek tego raka na chemioterapetyki (np. gemcytabinę, oksaliplatynę, irynotekan) pozwoliłoby uzyskać zwiększoną odpowiedź na leczenie i wydłużenie średniego czasu życia pacjentów. Obecnie większość prac skupia się na działaniu na podścielisko tego nowotworu, ale również spora część badań związana jest z próbami zastosowania naturalnych substancji takich jak kurkumina czy resweratrol. Do badań wybrano trzy linie nowotworowe: odporne komórki EPP85-181P i EPP85-181RNOV oraz linii przerzutowej AsPC-1. Dodatkowo badania rozszerzono o prawidłową linię komórek trzustkowych H6c7. Stosując metodę MTT wykazano cytotoksyczne działanie resweratrolu na komórki raka trzustki. Jako maksymalne stężenie wybrano stężenie 200  $\mu$ M, które jest mało realistyczne z punktu widzenia aplikacyjnego,



jednakże stężenia 25  $\mu\text{M}$  lub nawet 50  $\mu\text{M}$  mogą być teoretycznie osiągalne po zastosowaniu odpowiednich nośników leków. W trakcie prac zbadano cykl komórkowy i wykazano, że w przypadku wybranych linii raka trzustki obserwuje się zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G0/G1 oraz częściowo w fazie S. Co ciekawe silniejszy cytotoksyczny wpływ resweratrolu obserwowano w przypadku linii opornych niż względem linii przerzutowej AsPC-1. W pracy badano również poziom białek proapoptotycznych (BAX i BCL2) oraz dokonano oceny poziomu białek związanych z procesem apoptozy. Wykonane w zespole reakcje immunocytochemiczne, które służyły ocenie wpływu resweratrolu na poziom białek związanych z procesem apoptozy, wykazały zależny od stężenia resweratrolu spadek poziomu białka Bcl-2 oraz wzrost poziomu białek Bax oraz Kaspazy-3 we wszystkich badanych liniach komórkowych, czego nie obserwowano w przypadku prawidłowej linii trzustkowej. W powyższych badaniach posługiwano się metodami real-time PCR, Western-blot, TUNEL, cytometrią przepływową, mikroskopią konfokalną, testami kometkowymi, immunocytochemicznymi i innymi. Doktorantka może się poszczycić szeroką znajomością metod i technik, którymi w większości biegle się posługuje. Opisane badania są kompletne i pozwalają scharakteryzować wpływ resweratrolu na komórki. Jako uzupełnienie wykonanych badań można by pokusić się o wykonanie badań poziomu wolnych rodników w komórkach, co przy inhibicji ekspresji tioredoksyny mogłoby przynieść ciekawe wyniki w porównaniu np. do linii prawidłowej i rzucić dodatkowe światło na mechanizm działania tego polifenolu. Mam jeszcze pytanie dotyczące badań synergizmu resweratrolu i daunorubicyny/mitoksantronu (rak żołądka) lub resweratrolu i gemcytabiny (rak trzustki) czy próbowano wykonać testy indeksu kombinacji dla tych substancji wobec opornych linii nowotworowych? Czyli inaczej mówiąc, czy możemy bezpośrednio potwierdzić działanie resweratrolu jako czynnika znoszącego lub przynajmniej zmniejszającego oporność wielolekową opornych komórek? Proszę o krótki komentarz do tych pytań.

W zestawie prac będących osiągnięciem doktorantki znajduje się także ciekawa praca przeglądowa, która z jednej strony stanowi osobne osiągnięcie kompilacyjne, wymagające selekcji a następnie syntetycznej analizy i opisu 101 publikacji, a przy okazji jest dobrym wstępem wprowadzającym w zagadnienia wpływu resweratrolu na nowotwory. W pracy opisano dostępne do tej pory informacje dotyczące wpływu resweratrolu na komórki nowotworów przewodu pokarmowego. Czytając tę publikację znajdujemy potwierdzenie dla

przypuszczenia, że resweratrol podnosi poziom ROS w niektórych typach nowotworów. Tutaj też znajduje się komentarz do obserwowanych dużych różnic pomiędzy osiąganymi obecnie stężeniami resweratrolu w osoczu po spożyciu czystego związku (najwyżej kilku mikromolowe stężenie), a jego stężeniem stosowanym w badaniach. Doktorantka zaznacza, że zastosowanie tego polifenolu musi być związane z rozwojem odpowiednich nośników dla tego związku, aby jego praktyczne zastosowanie było możliwe.

Wykonane badania stoją na wysokim poziomie merytorycznym i instrumentalnym i stanowią ważne uzupełnienie wiedzy na temat mechanizmu działania resweratrolu oraz jego potencjalnej roli w nowych terapiach nowotworów. Z technicznego punktu widzenia wszystkie opublikowane prace zostały starannie zredagowane i poprawione przez ich recenzentów. Z tego powodu nie mam komentarzy do braków technicznych publikacji. Osobne Wprowadzenie i Wstęp oraz Streszczenie zostało dobrze napisane. Nie bardzo rozumiem pierwszego zdania trzeciego akapitu Wprowadzenia, poza tym nie mam zastrzeżeń do pozostałej części w języku polskim.

Podsumowując wykonane badania wnoszą znaczący wkład do wiedzy związanej z wpływem resweratrolu na komórki raka żołądka i trzustki. Zostały one starannie zaplanowane i wykonane. Wkład doktorantki w prace jest dominujący, a wyniki przekonujące. Współczynnik oddziaływania prac jest wystarczający, a cały dotychczasowy dorobek także zasługuje na uwagę. Pozostaje kontynuować rozpoczęte prace i rozwinąć je o badania praktyczne na modelu zwierzęcym.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska spełnia warunki ustawowe określone w art. 13. ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2016, poz. 882), dlatego wnioskuję do wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Biologicznych o dopuszczenie Pani mgr Katarzyny Ratajczak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

